

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 3 月 28 日 (28.03.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/24189 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/185, 7/00,
7/075, 7/08, A61P 43/00, 17/14, 17/16

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07915

(22) 国際出願日: 2001 年 9 月 12 日 (12.09.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-283069 2000 年 9 月 19 日 (19.09.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8010 東京都中央区銀座7-5-5 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浜田千加

(HAMADA, Chika) [JP/JP]. 田島正裕 (TAJIMA, Masahiro) [JP/JP]. 中間康成 (NAKAMA, Yasunari) [JP/JP]. 高橋唯仁 (TAKAHASHI, Tadahito) [JP/JP]; 〒224-8558 神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社 資生堂 リサーチセンター(新横浜) 内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 高野俊彦, 外(TAKANO, Toshihiko et al.); 〒162-0834 東京都新宿区北町32-802 高野・志波国際特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, KR, US.

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CELL ACTIVATOR

(54) 発明の名称: 細胞賦活剤

(57) Abstract: A cell activator; a hair cell controlling agent; a hair growth stage-extending agent; a hair cell growth activator; a trichoepithelial cell proliferation activator; and an external trichilemmal cell proliferation activator each containing taurine as the active ingredient. These agents are usable as the components of hair growth stimulants and exert effects concerning hair cell activation.

(57) 要約:

本発明は、タウリンを有効成分とする細胞賦活剤、毛髪細胞コントロール剤、毛髪成長期延長剤、毛髪細胞増殖活性剤、毛包上皮系細胞増殖活性剤、外毛根鞘細胞増殖活性剤に関する。本発明は、育毛料の配合成分として利用され、毛髪細胞活性化に関する効果を発揮する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 02/24189 A1

明細書

細胞賦活剤

5 技術分野

本発明は、細胞賦活剤、毛髪細胞コントロール剤、毛髪成長期延長剤、毛髪細胞増殖活性剤、毛包上皮系細胞増殖活性剤、外毛根鞘細胞増殖活性剤に関する。本発明は、育毛料の配合成分として利用され、毛髪細胞活性化に関する効果を発揮する。

10

背景技術

高齢化社会、ストレス社会と称される現代社会は、様々な原因により脱毛の危機にさらされる機会が多い。そのため、優れた育毛料の開発が精力的に行なわれている。

15 育毛料が毛髪に与える効果としては、発毛誘導効果（発毛促進効果、成長期誘導効果）、毛髪を太くする効果、毛髪成長期延長効果、 5α -レダクターゼ阻害効果、血行促進効果、殺菌効果、フケ防止効果、保湿効果、抗酸化効果等が挙げられる。

20 しかしながら、精力的な育毛料の開発にもかかわらず、従来の育毛料においては、その脱毛防止、発毛効果等の育毛作用は必ずしも十分なものではなかった。これは、脱毛などの原因が多岐にわたり、また、発毛の機構も非常に複雑であるためである。

従来の育毛料は、脱毛を比較的大雑把な概念、言い換えれば、漫然と「脱毛」という現象のみを捉えて開発されており、そのメカニズムにまで着目し、
25 探求して開発されたものは多くはない。

この大きな理由の一つとしては、メカニズムに着目した育毛効果を簡便に

2

検定できる育毛薬剤検定方法が十分に確立されていなかったことに由来する。特に毛髪成長期延長効果などを検定する育毛薬剤検定方法の確立は難しく、結果として、これまで提供されてきた育毛料は、毛周期の成長期に毛髪を誘導して育毛する発毛誘導効果に着目したものが多かった。

- 5 本発明者等は、インビトロ (in vitro) で行う簡便な育毛薬剤検定方法を確立し、この育毛薬剤検定方法を用いて、多くの化合物を検討し、本発明を完成するに至った。

本発明の目的は、養毛料などの配合成分となる育毛関連効果剤を提供することにある。

10

発明の開示

すなわち、本発明は、タウリンを有効成分とする細胞賦活剤を提供するものである。

- また、本発明は、タウリンを有効成分とする毛髪細胞コントロール剤を提供するものである。
- 15

さらに、本発明は、タウリンを有効成分とする毛髪成長期延長剤を提供するものである。

また、本発明は、タウリンを有効成分とする毛髪細胞増殖活性剤を提供するものである。

- 20 さらに、本発明は、タウリンを有効成分とする毛包上皮系細胞増殖活性剤を提供するものである。

また、本発明は、タウリンを有効成分とする外毛根鞘細胞増殖活性剤を提供するものである。

- 25 さらに、本発明は、タウリンを有効成分とする毛髪はり・こし改善剤を提供するものである。

3

図面の簡単な説明

図 1 は、外毛根鞘細胞の増殖度を表す図である。

図 2 は、毛髪のねじりトルクの増加を表す図である。

5 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の構成について詳述する。

本発明に用いるタウリンは、 $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ の分子式で表される化合物であり、これまで、細胞賦活剤、毛髪細胞コントロール剤、毛髪成長期延長剤、毛髪細胞増殖活性剤、毛包上皮系細胞増殖活性剤、外毛根鞘細胞増殖活性剤、毛髪はり・こし改善剤としての効果を正確に確認されたことはな

10 い。

本発明は、後述する育毛薬剤検定方法によって、少なくとも毛包上皮系細胞の分裂増殖活性を維持又は促進することにより毛髪の成長期を維持又は延長する効果を確認できるタウリンを有効必須成分とする毛髪関連薬剤であり、

15 育毛料、養毛料に配合するための「個別効能薬剤」としての特徴を有する。

本発明は、例えば、毛根近傍における毛包上皮系細胞の増殖が緩徐であること等により成長期が短くなって、相対的に成長期毛よりも休止期毛の割合が多くなってしまいうことに起因する脱毛症に特に有効な薬剤である。また、他の個別効能を有する育毛薬剤と組み合わせて用いることにより、幅広いの

20 脱毛症において、総合的かつ相乗的な効果を上げることが可能である。すなわち、本発明の薬剤は、総合的な育毛効果の概念を有する一般的育毛料とは一線を画する用途を有するものである。

本発明の薬剤はタウリンからなる。タウリンを適当な基剤に配合し製剤化して有効成分として用いる場合は、本発明の効果が発揮されるように具体的

25 な形態等に応じてその配合量が適宜決定される。通常の配合量は基剤全体に対して 0.00001～20 質量%、好ましくは、0.01～10.0 質

4

量%である。本発明の薬剤を毛髪関連製品に配合する場合においても、タウリンの含有量が前記含有量になることが好ましい。0.00001質量%未満の配合量では、毛髪細胞賦活効果が十分に発揮されず、また、20質量%を超えて配合しても、含有量の増加に見合った効果の増大を見込めないばかりではなく、製剤上支障をきたす傾向が顕著となり好ましくない。

本発明の薬剤は、特に優れた毛包系細胞増殖活性作用又は外毛根鞘細胞増殖活性作用に基づく毛髪成長期延長効果を有する。例えば、毛根近傍における毛包上皮系細胞の増殖が緩徐であること等により成長期が短くなって、相対的に成長期毛よりも休止期毛の割合が多くなってしまいうことに起因する脱毛症に特に有効である。また、他の個別効能を有する育毛料と組み合わせて用いることにより、特定の脱毛症においては相乗的な効果を上げることが可能である。

本発明の薬剤の毛周期における成長期の維持又は延長作用を特定して確認する手段は、その特定方法自体がその作用を特定するために妥当なものである限り特に限定されない。例えば、インビトロ (in vitro) における特定方法も、インビボ (in vivo) における特定方法も用いることができるが、その簡便性と有効性を考慮すると、インビトロにおける特定方法を用いることが好ましい。

以下に、インビトロにおける特定方法の一つである、毛包系上皮培養細胞の増殖効果を検討することを特徴とする特定方法について簡単に説明する。この方法は、「毛包上皮系培養細胞に無血清培地中で対象物質を接触させることによって、その細胞の増殖活性の有無及び強弱を特定し、その対象物質の毛周期における成長期を延長する効果を検定する育毛薬剤検定方法」である。毛髪の伸長に直接的に関係する毛包上皮系細胞に着目し、この培養細胞を用いることによって、所望する毛周期における成長期を延長する効果を特定するインビトロの育毛薬剤検定方法である。

5

この育毛薬剤検定方法においては、動物（ヒトを含む）の毛包上皮系細胞を単離して得た培養細胞である「毛包上皮系培養細胞」に対象物質を接触させて、その増殖の有無及び強弱を特定する。毛包上皮系細胞は、特に毛根近傍の外毛根鞘細胞とマトリクス細胞等の細胞のことを指し、内側の毛乳頭細胞は除外される。毛周期における成長期は、まさにこの毛髪が伸長している時期、すなわち毛包上皮系細胞が分裂して増殖している時期であり、同退行期及び休止期はこれが鈍化して休止する時期である。つまり、毛周期における成長期を延長させる物質は、その投与により毛包上皮系細胞の分裂及び増殖活性を維持することによって、毛髪が毛周期における退行期及び休止期への移行を防ぐ物質、すなわち、毛包上皮系細胞の増殖を促進又は維持し続ける物質であることが結論付けられる。なお、他のインビトロの育毛薬剤検定方法として、例えば、対象物質を動物の毛乳頭細胞に作用させて、その増殖効果を判定する方法を挙げることもできる。

インビボにおける特定方法としては、例えば、ヌードマウスに対象物質を投与し、このヌードマウスの体表の発毛部位の状態を特定して、対象物質の毛周期における成長期を延長する効果を検定する育毛薬剤検定方法などを挙げられる。原則的には無毛であるが、その体表に経時的にその発毛部位が移動する特徴的な発毛をするヌードマウスにおける発毛部位の広さと発毛部位の移動速度を特定することによって、毛周期における成長期の長さを検定する方法等である。

本発明の薬剤がとり得る剤型は、育毛料に配合できて、外皮に適用可能な剤型であれば特に限定されない。本発明の薬剤は、例えば、ヘアトニック、ヘアークリーム、ヘアムース（登録商標）、シャンプー、リンス等の製品に配合できる。

本発明の薬剤は、本発明の効果を損なわない限りにおいて、化粧品、医薬部外品、医薬品等において一般的に用いられる各種油性若しくは水性成分、

6

保湿剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、香料、色剤、各種薬剤等を配合して、常法により製剤化することができる。

実施例

- 5 次に本発明を実施例等によりさらに具体的に説明する。本発明は以下の実施例のみに限定されない。以下の実施例等において「%」と表示され、かつ内容量を示すものは特に断りのない限り質量%を意味する。

「実施例 1」

- 10 タウリンの毛髪成長期延長作用を評価した。始めにインビトロの細胞増殖試験について説明する。

<毛包上皮系培養細胞を用いた細胞増殖試験>

A. ヒト毛包上皮系細胞

- 15 1. ヒト毛包上皮系細胞の採取

外科手術の副産物として得られたヒト男性頭皮から毛周期における成長期の毛包を実体顕微鏡下で機械的に採取した。この成長期の毛包を1000U/ml dispase・0.2%コラゲナーゼを含むダルベッコの改変MEM (DMEM) で30分間、37℃で処理し、注射針の先を用いてdermal sheath やdermal papilla、毛球部上皮組織を除去して、0.05%トリプシン・0.02%EDTAを含むリン酸緩衝液〔PBS (－) : (－) とはカルシウムイオンやマグネシウムイオンを含まない意味である〕で5分間、37℃で処理した。

- 20 次に、コラーゲン (Type I) コーティングした培養皿に毛包を静置し、外殖片培養を行った。なお、この際の培地は、無血清培地〔Keratinocyte Growth Medium (KGM)〕を用いた。この培養の4～5日後に、毛包の培養皿への接着及び細胞の増殖が確認できた時点で培地を交換し、これ以降2日

おきに培地交換を行った。

このようにして増殖させた細胞を、0.05wt%トリプシン-0.02%EDTAで37℃で5分間処理した後、等量の0.1%トリプシンインヒビターで反応を停止させ、遠心処理(800×g、5分間)を施して細胞を回収した。次に、細胞を上記の無血清培地に浮遊させて、5000cells/cm²の密度でコラーゲンコーティング (Type I) した培養皿に播種し、細胞がsubconfluentになるまで2日おきに培地交換を行い、再び0.05wt%トリプシン-0.02%EDTAで37℃で5分間処理した後、等量の0.1%トリプシンインヒビターで反応を停止させ、遠心処理(800×g、5分間)を施して、これにより得られたヒト毛包上皮系細胞に細胞凍結液 (セルバンカー: ダイアトロン製) を添加し、 1.0×10^6 cell/mlの濃度に調整して、各凍結チューブに 1.0×10^6 cellずつ入れ、これを凍結保存した。なお、これらの細胞数は、血球算定板で算出した。

2. 対象物質のアッセイ

上記工程により得た毛包上皮系細胞の線維芽細胞混入率 (FB混入率) を測定 (3000倍、5視野) し、その結果FB混入率が3%以上のものは、アッセイの対象から除外した。そして、この毛包上皮系細胞を培養フラスコ中に播種後、これを0.05%トリプシンと0.02%EDTAで処理した後、0.1%トリプシンインヒビターで反応を停止後、系を1500rpmで5分間遠心処理を施し、上清を除去し、残渣にKGM培地20mlを添加して、細胞懸濁液を調製した。

0.2ml/wellの割合で、96well-plate (I型コラーゲンコーティングプレート: ファルコン社製) に播種し (1.0×10^4 cell/well)、細胞がウェルの底に沈むまで約20分間室温下で放置した。その後、37℃、5%CO₂で1日間培養を行い、所望するヒト毛包上皮系培養細胞を得た。

8

B. ラット毛包上皮系細胞

1. ラット毛包上皮系細胞の採取：

(1) 毛包の採取

- 新生児（3～4日令）ラットの背部皮膚を採取し、この採取した背部皮膚を1%PSF含有PBS（－）に2枚ずつ浸した。その後、皮膚脂肪層から下の皮下脂肪や皮膜等を解剖用ハサミで除去した。次いで、再びこの背部皮膚を1%PSF含有PBS（－）に浸し、さらにこれを0.25%トリプシン含有PBS（－）（0.02%EDTA含む。以下、同様である。）中に4℃で一晩浸した。
- このトリプシン溶液中における浸漬後、背部皮膚の真皮層と表皮層をピンセットで剥がした後、真皮層を0.35%のコラゲナーゼを含有させたHam's F12培地〔組成(mg/L)：1-Alanin(8.9)、1-Arginine (HCl:211)、1-Asparagine(13.2)、1-Asparatic acid(13.3)、1-Cysteine (HCl:31.5)、1-Glutamic acid(14.7)、1-Glutamine(146)、Glycine(7.5)、1-Histidine (HCl:19)、1-Isoleucine(3.9)、1-leucine(13.1)、1-Lysine(HCl:36.5)、1-Methionine(4.5)、1-Phenylalanin(5.0)、Proline(34.5)、1-Serine(10.5)、1-Threonine(11.9)、1-Tryptophane(2.0)、1-Tyrosine(5.4)、1-Valine(11.7)、Biotine(0.0073)、Choline(Cl:14.0)、VitaminB12(1.36)、葉酸(1.32)、Inositol(18.0)、Nicotinamide(0.037)、パントテン酸(Ca:0.477)、VitaminB6(HCl:0.062)、VitaminB2(0.038)、VitaminB1(HCl:0.337)、CaCl2(2H2O:44.0)、CuSO4・5H2O(0.0025)、FeSO4・7H2O(0.834)、KCl(224.0)、MgCl2(6H2O:122)、”Proc.Natl.Acad.Sci.USA、53、288(1965)”以下同様である〕が入った100mm dishに移し、ハサミで裁断した。この裁断物を含む培地を37℃で35分間浸透を行った(60rpm)。
- 浸透後、このコラゲナーゼ反応物中に塊状のものが見えなくなるまでピペッティングを行い、これを50ml遠沈管に移し、DNase (10000unit)を含有

させたHam's F12培地を添加し、5分間放置した。

放置後、得られた懸濁液をさらにピペッティングした後、ナイロンメッシュ (Nytex 157 mesh) で濾過し、これを50ml遠沈管に移した。懸濁液を半量ずつに分け、それぞれについてPBS (－) を容量が30mlになるまで懸濁液を希釈し、次いでこの希釈した懸濁液に遠心処理を施した (4℃、400rpm、5分間)。遠心後、上清を除いて脂肪分を系から除去した。次いで、残渣にPBS (－) を25ml添加して懸濁後、これにさらに遠心処理を施した [(4℃、400rpm、5分間) × 3回]。この遠心操作により得られた残渣が、ラットの背部皮膚における毛包である。

10 (2) 毛包上皮系細胞の採取

上記操作により得られた毛包に、0.25%トリプシン含有PBS (－) を5ml添加して、細胞懸濁液を37℃で5分間インキュベートした。インキュベート終了後、5mlの等量の牛胎児血清 (FBS) とHam's F12培地を添加して、細胞懸濁液をセルストレーナー (100μm Nalgene 社製) で濾過後、50ml遠沈管に入れて、この細胞懸濁液に遠心処理を施した (4℃、1500rpm、5分間)。この系から上清を除去して、残渣として所望する毛包上皮系細胞を得た。

この毛包上皮系細胞に細胞凍結液 (セルバンカー: ダイアトロン製) を添加し、 1.5×10^7 cell/mlの濃度に調整して、各凍結チューブに 1.5×10^7 cellずつ入れ、これを凍結保存した。なお、これらの細胞数は、血球算定板で算出した。

2. 毛包上皮系細胞の前培養

系に混入している線維芽細胞を可能な限り系から除去するために、上記工程により得られた毛包上皮系細胞の前培養を行った。以下、その手順について説明する。37℃の恒温槽で、上記工程により得た凍結細胞を融解した。次いでFAD培地 [Ham's F12培地 (後述) とMEN培地を容量比で

10

3対1で混合したものに、インシュリン(5.0 μ g/ml)、ハイドロコルチゾン(0.45 μ g/ml)、エプidermalグロウスファクター(EGF)(10.0ng/ml)、コレラトキシン(10⁻⁹M)及びウシ胎児血清(10%)を含有させた培地、以下同様である]を10ml添加し、細胞溶液を希釈して系に遠心処理を施した(1
5 0℃以下、1500rpm、5分間)。遠心後、上清を除去し、系にFAD培地を10ml添加して、細胞塊が認められなくなるまでピペッティングを繰り返した。

得られた細胞数を血球算定板で算出し、FAD培地で2.5×10⁵cell/mlの濃度になるように調整した。I型コラーゲンでコーティングした
10 75cm³のフラスコに細胞を播種して、これを37℃、5%CO₂で一晩培養した。

培養後、系をPBS(−)10mlで2回洗浄し、0.25%トリプシン含有PBS(−)を2ml添加して、これを37℃、5%CO₂で4分間インキュベートした。次に、系に牛胎児血清(FBS)を2ml添加して、1回軽く
15 ゆすった後で上清を除去して、系に混入している線維芽細胞を除去した。

さらに、系にKGM培地〔表皮角化細胞基礎培地(Keratinocyto growth medium): Keratinocyto basal medium {KBM培地(改変MCDB153培地: クローネティックス社製)}に、ウシ脳下垂体エキス(BPE)(0.4vol%)、インシュリン(0.5 μ m/ml)、ハイドロコルチゾン(0.5 μ m/ml)、h-
20 EGF(0.1ng/ml)を添加した培地。以下同様である]を15ml添加し、37℃、5%CO₂で3日間培養した。

3. 対象物質のアッセイ

上記工程により得た毛包上皮系細胞を播種した培養フラスコの線維芽細胞混入率(FB混入率)を測定(3000倍、5視野)し、その結果FB混入
25 率が3%以上のものは、アッセイの対象から除外した。

系をPBS(−)10mlで2回洗浄し、0.25%トリプシン含有PBS

11

(一) を 2 ml 添加して、これを 37℃ で 3 分間インキュベートした。次いで上皮系細胞と線維芽細胞とのトリプシンに対する反応性の違いを利用して、系から線維芽細胞を除去するために、トリプシンを除去し、再び 0.25% トリプシン含有 PBS (一) を 2 ml 添加して、37℃、20 rpm で 5 分間振盪した。

次いで、細胞のはがれを顕微鏡下で確認した後、10% FBS 含有 DME M 培地を 10 ml 添加して、50 ml 遠心チューブ中でピペッティングを行い、系を 1500 rpm で 5 分間遠心処理を施した。上清を除去し、KGM 培地 20 ml を添加して、細胞塊がなくなるまでピペッティングを行った。

- 10 懸濁液をセルストレーナー (100 μ m Nalgene 社製) で濾過後、50 ml 遠沈管に入れて、懸濁液中の生細胞数を血球算定板で算出し、系に KGM 培地を添加して、系の中の細胞濃度が 5.0×10^4 cell/ml になるように調整した。次いで、0.2 ml/well の割合で、96 well-plate (I 型コラーゲンコーティングプレート: ファルコン社製) に播種し (1.0×10^4 cell/well)、
- 15 細胞がウエルの底に沈むまで約 20 分間室温下で放置した。その後、37℃、5% CO₂ で 1 日間培養を行い、所望するラット毛包上皮系培養細胞を得た。

C. 試験培地の調製

(1) 対象物質添加培地の調製

- 20 タウリンを約 1.5 mg 秤量し、KBM 培地で 1% 溶液になるように調製し、0.45 μ m フィルターで濾過滅菌した。次いで、KBM 培地に、上記の溶液を 10000 倍量添加した [対象物質濃度: 1.0×10^{-5} %]。

(2) コントロール培地の調製

- 25 KBM 培地をネガティブコントロールとして用いた。ポジティブコントロールとして、ネガティブコントロールの KBM 培地に、細胞増殖因子のインシュリン (5 mg/ml) を 2 μ l、ヒドロコチゾン (0.5 mg/ml) を 2 μ l

12

添加した培地を用いた。

D. 対象物質培地交換

上記A、Bにおいてヒト毛包上皮系培養細胞及びラット毛包上皮系培養細胞を調製した96well-plate中のKGM培地を、対象物質添加培地及びコントロール培地（200 μ l/well）と交換して、交換後37℃、5%CO₂で2日間培養した。なおこの培地の交換は、ウェル内のKGM培地を、底面に付着している細胞を傷つけないように留意しつつアスピレーターで抜いて、その後速やかに対象物質添加培地等をウェルの両端から添加することにより行った。

E. 細胞増殖の測定

アラマブルー(alar blue: アラマバイオサイエンス社製)を培地量(容量)に対して1/10量を添加して、37℃(5%CO₂)で6時間インキュベートした。インキュベート後、系の595nm及び570nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Micro plate reader: Bio RAD社製)を用いて測定し、下記計算式に従って、細胞増殖度を算出した。

(対象試料の細胞増殖度) = (対象試料のアラマブルー還元率) / (ネガティブコントロールのアラマブルー還元率) × 100 (%)

さらに、下記計算式に従って、タウリンの毛包上皮系細胞増殖促進作用を判定した。

(対象試料の細胞増殖促進指標) = ((対象試料の細胞増殖度) - (ネガティブコントロールのアラマブルー還元率)) / ((ポジティブコントロールの

13

アラマブルー還元率) - (ネガティブコントロールのアラマブルー還元率))

「結果」

- 5 細胞増殖促進作用は、ネガティブコントロールが0、ポジティブコントロールが1に対して、タウリンはヒト由来毛包上皮系培養細胞に対して0.8及びラット由来毛包上皮系培養細胞に対しても0.8であった。この結果より、毛包上皮系培養細胞の増殖活性が明らかに認められることが判明した。すなわち、タウリンには、毛髪成長期延長活性が認められることが明らかに
- 10 になった。

「実施例2」

タウリンの不死化外毛根鞘細胞増殖作用を評価した。始めに、不死化外毛根鞘細胞増殖試験について説明する。

15

<不死化外毛根鞘細胞増殖試験>

「不死化外毛根鞘細胞の培養」

- ヒト頭皮より実体顕微鏡下において毛包をハサミで単離する。皮脂腺下部で毛包を切り離しコラゲナーゼ及びディスパーゼで酵素処理を行う。毛球部
- 20 をハサミで切り離し除き、毛幹をピンセットで分離する。毛幹をトリプシンで酵素処理し、トリプシンインヒビターで反応を停止する。遠心して、上清をすて、外毛根鞘細胞を回収する。コラーゲンコートした培養フラスコに回収した細胞をKeratinocyte growth medium (KGM) 培地で播種し、CO₂インキュベーター中で培養する。

- 25 ウイルス及び導入遺伝子

アデノウイルスベクターであるΔE1/XのE1A領域を、複製開始点を

14

欠失させたSV40のLarge T抗原遺伝子に置換したウイルス (Doren and Gluzman, 1984; Mol. Cell. Biol. 4, 1653-1656) を用いた。

T抗原遺伝子の導入

細胞のクローニングコンプレントの約50%まで培養した継代1代目の培養外毛根鞘細胞をK-SFMで洗浄した後に、これに1, 10又は30 MOI (multiplicity of infection)の量で上記ウイルスを添加して感染させた。以後、通常の細胞と同様に継代培養を続け、通常の細胞の増殖が止まってしまふ継代数まで達した後にクローニングを行った。クローニングにおいては、細胞を直径10cmシャーレあたり10³ ~ 10⁴ 個だけ播種し直し、増殖がよく、細胞形態が通常細胞と変わらないものをピペットマンのチップを用いてピックアップし、これを24ウェルプレートに移して培養し、この時点でも増殖が良い細胞を選択した。なお、選択された細胞株も通常の細胞と同様に継代培養を続けた。

その結果、ウイルスを感染させなかった外毛根鞘細胞は継代5代くらいで増殖を停止してしまった。T抗原導入毛乳頭細胞は、クローニング後継代7代ほどで見かけ上増殖が停止してしまつたように見えたが、さらに培養を継続すると、見かけ上再び増殖を開始したように見えた。おそらく継代7代でクライシスを迎え、ここでも何らかの変異が起こり、不死化細胞となったものと予想された。クローニングの際、いくつかのクローンを選出したものの、クライシスの時期を越えて増殖を続ける細胞株1クローンを得た。

細胞増殖評価

外毛根鞘細胞はPBS(-)で2回洗浄する。トリプシンで酵素処理を行い、細胞を剥がす。トリプシンインヒビターで反応を停止し、遠心して上清をすて、外毛根鞘細胞を回収する。KGM培地を加え細胞浮遊液を調製する。コラーゲンコートした24穴培養プレートに細胞を播種し、CO₂インキュベーター中で培養する。翌日、被検物質を添加した培地に交換する。4日培養後、細胞を

15

PBS(-)で洗浄し、trypsinで細胞を剥がす。この状態でプレートごと細胞を冷凍する。

被検物質の調製

被検物質のタウリンは、Keratinocyte basal medium (KBM) 培地で 50
5 mMに調製し、濾過滅菌をおこなった。これを原液としてKBM培地で希釈し、
被検物質濃度が10 nM、1 μ M、100 μ M、10 mMになるよう調製した。
ネガティブコントロールはKBM培地のみとした。

細胞DNA測定

細胞を解凍後、Hoechst33258を各穴に加え、ソニケーションをかけ細胞を
10 破砕する。これをキュベットに移し、励起波長356nm、蛍光波長460nmで蛍光
強度を測定する。ネガティブコントロールの蛍光強度を100として、DNA
量の相対値を計算し細胞増殖度算出した。

図1に結果を示す。この結果より、タウリンには、不死化外毛根鞘細胞活性作用があることが分かった。

15 次に、毛髪成長期延長作用に基づくその育毛効果を検討する。

〔実施例3〕 液状毛髪成長期延長剤

タウリン0.8%を、70%エタノール90%、オレイン酸ナトリウム0.05%、ドデシルベンゼンスルホン酸0.49%、硬化ヒマシ油エチレンオ
20 キシド(40モル)付加物0.5%及びイオン交換水(残余)と混合攪拌して溶解させた。さらにイオン交換水(10%)を添加混合して、液状の毛髪成長期延長剤を得た。この液状の育毛料の処方において、タウリンを除去して調整した液状の剤を対照として調整した(比較例1)。

25 〔実施例4〕 乳液状毛髪成長期延長剤

以下の処方の乳液状毛髪成長期延長剤を作成した。

16

配合成分		配合量 (質量%)
(A相)		
	タウリン	0.05
	ポリオキシエチレン (60モル) 付加硬化ヒマシ油	2.0
5	グリセリン	10.0
	ジプロピレングリコール	10.0
	1, 3-ブチレングリコール	5.0
	ポリエチレングリコール1500	5.0
(B相)		
10	セチルイソオクタネート	10.0
	スクワラン	5.0
	ワセリン	2.0
	プロピルパラベン	2.0
(C相)		
15	カルボキシビニルポリマー1%水溶液	30.0
	ヘキサメタリン酸ソーダ	0.03
	イオン交換水	9.3
(D相)		
	イオン交換水	4.5
20	(E相)	
	KOH	0.12
	イオン交換水	5.0
<p><製造法> A相、B相をそれぞれ60℃で加熱溶解し、混合してホモミキサー処理しゲルを作る。これにD相を徐々に添加しホモミキサーで分散した。</p>		
25	次にこれに溶解したC相を加え、最後に溶解したE相を添加し、ホモミキサーで乳化してO/W乳液型の毛髪成長期延長剤を調製した。	

〔実施例 5〕 クリーム状毛髪成長期延長剤

配合成分	配合量 (質量%)
(A相)	
5 流動パラフィン	5. 0
セトステアリルアルコール	5. 5
グリセリルモノステアレート	3. 0
EO (20モル) - 2 - オクチルドデシルエーテル	8. 0
プロピルパラベン	0. 3
10 香料	0. 1
(B相)	
タウリン	5. 0
グリセリン	8. 0
ジプロピレングリコール	20. 0
15 ポリエチレングリコール 4000	5. 0
ドデシル硫酸ナトリウム	0. 1
ヘキサメタリン酸ソーダ	0. 005
イオン交換水	39. 995
<p data-bbox="212 1451 1390 1528"><製造法> A相、B相をそれぞれ加熱溶解し混合し、ホモミキサーで乳化して、クリーム状の毛髪成長期延長剤を得た。</p>	

「毛髪成長期延長剤の育毛作用の検討」

上記で得られた毛髪成長期延長剤の脱毛防止、発毛効果等の育毛作用を調べるために、以下の方法でヒトに対してトリコグラム試験及び実使用テストを実施した。被験試料及び対照試料は、実施例 3～5 の本発明の毛髪成長期延長剤、70%エタノール、比較例 1 である。

試験方法

- 上記試料の使用前と使用後の抜去毛髪の毛根を顕微鏡下で観察し、毛根の形態から、成長の止まった毛の毛根である「休止期毛根」数を計数し、その割合の増減によってこれらの試料の育毛作用を比較した。すなわち、被験試料及び対照試料をそれぞれ男性被験者10名の頭皮に1日2回、1回2mlずつ6カ月間連続して塗布し、塗布直前及び6カ月間塗布終了直後に、被験者1名につき100本ずつ毛髪を抜去し、それぞれの毛根を顕微鏡下で観察した。試験の結果を、下記「表1」に示す。

10

表1

試料（対象及び育毛剤番号）	休止期毛根の割合			育毛効果の評価
	20%以上減少（%）	±20%（%）	20%以上増加（%）	
対象（70%エタノール）	10	40	50	無効
実施例3	50	40	10	有効
実施例4	60	30	10	有効
実施例5	50	30	20	有効
比較例1	20	40	40	無効

この結果から、本発明の毛髪成長期延長剤には毛髪成長期延長効果に基づく育毛効果が認められた。

15 「はりとしを毛髪に付与する効果」

タウリンを必須成分とする本発明は、毛髪にはりとしを付与する効果を有し、毛髪はり・こし改善剤として利用できる。始めに試験方法について説明する。

試験試料

- 20 毛髪は、パーマネントウェーブ、ヘアカラー、ブリーチ等の化学的処理履歴のない19才女性の毛髪を使用した。毛先部約20cmを、所定のシャン

- ブー液に1時間浸漬した後、流水中に1分間洗浄し、通常環境下で24時間以上乾燥したものを、健常毛試料とした。上記健常毛を所定のブリーチ剤を用いて、室温にて30分ブリーチ処理を行い、その後流水中で1分間洗浄した。ブリーチ処理を4回繰り返し、洗浄後通常環境下で乾燥したものをブリーチ処理毛（BL処理）とした。

タウリン処理

1mol / l のタウリン水溶液 20ml に毛髪1本を一晩浸漬し、25℃・50%RH環境下にて試験試料の毛髪を乾燥させた。

ねじりトルクの測定

- 10 カトーテック社製ねじり試験機 KES-YN-1 を用いて、25℃・50%RH環境下にて測定を行った。測定は、タウリン水溶液による処理前に測定を行い、それをコントロールとした。ねじり角度は $\pm 1080^\circ$ 、 $18^\circ / \text{sec}$ の速度にてねじりを与えた。ねじり角 $\theta = 360^\circ \sim 720^\circ$ における、ねじり角 θ に対するねじりトルク T_f の増加分である $B = \tan(T_f / \theta)$ を、ねじり剛性B値とし、タウリン水溶液による処理前後でのB値の比で評価した。結果を図2に示した。

この結果より、タウリン処理した毛髪は、ねじりトルクが増加しており、毛髪にはりとこしを付与していることが分かる。

- 20 本発明の薬剤を配合した好ましい製品の処方例を示す。タウリンを配合した以下のシャンプー、リンスは、泡もち、泡質に優れた毛髪洗浄料であり、髪が生える前の細胞レベルから毛髪を元気にし、生えた髪そのものにはりとこしを与え生まれたてのような元気な髪にする効果を期待できる育毛毛髪洗浄料である。

- 25 [処方例1] シャンプーの処方

配合成分

配合量（質量％）

20

	タウリン	8.0
	ポリオキシエチレンアルキルアンモニウム	15.0
	アミドプロピルジメチル酢酸	3.0
	ヤシ油脂肪酸モノエタノールアミド	1.6
5	ジステアリン酸エチレングリコール	0.6
	ジメチルシリコン(5000 c s)エマルジョン 40%液	1.8
	安息香酸ナトリウム	0.2
	カチオン化セルロース	0.3
	イオン交換水	69.5

10

〔処方例2〕 リンスの処方

配合成分	配合量 (質量%)
タウリン	0.6
エキセコールD-5	3.4
15 ジメチルシリコン	0.5
ステアリルアルコール	7.5
ステアリン酸ジメチルアミノプロピルアミド	2.5
イオン交換水	85.5

20 〔処方例3〕 シャンプーの処方

配合成分	配合量 (質量%)
タウリン	3
N-ヤシ脂肪酸-N-メチルタウリンNa塩	10
ヤシ脂肪酸ジエタノールアマイド	4
25 ヤシ脂肪酸アミドプロピルベタインNa	10
マーコート550 (約8%水溶液)	5

21

クエン酸	0.5
安息香酸Na塩	適量
香料	適量
精製水	残部

5

〔処方例4〕 シャンプーの処方

配合成分 配合量 (質量%)

	N-ヤシ脂肪酸-N-メチルタウリン タウリン Na塩	12
	ヤシ脂肪酸アミドプロピルベタインNa塩	5
10	ラウリン酸プロピレングリコール	1.5
	カチオン性セルロース	0.3
	クエン酸	0.5
	安息香酸Na塩	適量
	香料	適量
15	精製水	残部

〔処方例5〕 シャンプーの処方

配合成分 配合量 (質量%)

	タウリン	0.3
20	ポリオキシエチレンラウリルエーテル Na塩	10
	ヤシ脂肪酸アミドプロピルベタインNa塩	5
	ヤシ脂肪酸モノエタノールアマイド	2
	カチオン化セルロース	0.5
	マーコート550 (約8%水溶液)	3.0
25	クエン酸	0.3
	安息香酸Na塩	適量

22

香料	適量
精製水	残部

〔処方例6〕 シャンプーの処方

5	配合成分	配合量 (質量%)
	タウリン	0.5
	ポリオキシエチレン라우リルエーテル Na 塩	8
	イミダゾリニウムベタインNa 塩	3
	ヤシ脂肪酸ジエタノールアマイド	4
10	カチオン性セルロース	0.3
	クエン酸	0.5
	ケーソンCG	適量
	香料	適量
	精製水	残部

15

〔処方例7〕 リンスの処方

	配合成分	配合量 (質量%)
	タウリン	0.1
	ジメチルシリコーン	5
20	ステアシルアルコール	2
	塩化ステアシルトリメチルアンモニウム	0.7
	グリセリン	2.0
	パラベン	適量
	香料	適量
25	精製水	残部

23

〔処方例8〕 リンスの処方

配合成分	配合量 (質量%)
タウリン	0.3
ジメチルシリコーン	10
5 ベヘニルアルコール	1.5
ステアシルアルコール	1
塩化ステアシルトリメチルアンモニウム	1.0
グリセリン	5.0
パラベン	適量
10 香料	適量
精製水	残部

〔処方例9〕 リンスの処方

配合成分	配合量 (質量%)
15 タウリン	0.1
ジメチルシリコーン	5
パラフィン	2
セチルアルコール	1.5
ステアシルアルコール	0.3
20 塩化ベヘニルトリメチルアンモニウム	0.5
イソプレングリコール	3.0
ケーソンCG	適量
香料	適量
精製水	残部

24

本発明によれば、細胞増殖の活発化させることにより、毛髪細胞をコントロールし、毛周期における成長期を延長し、毛髪細胞の毛包上皮系細胞及び外毛根鞘細胞の増殖を活性化し、さらに、毛髪にはりとしを与える毛髪関連薬剤が提供される。

25

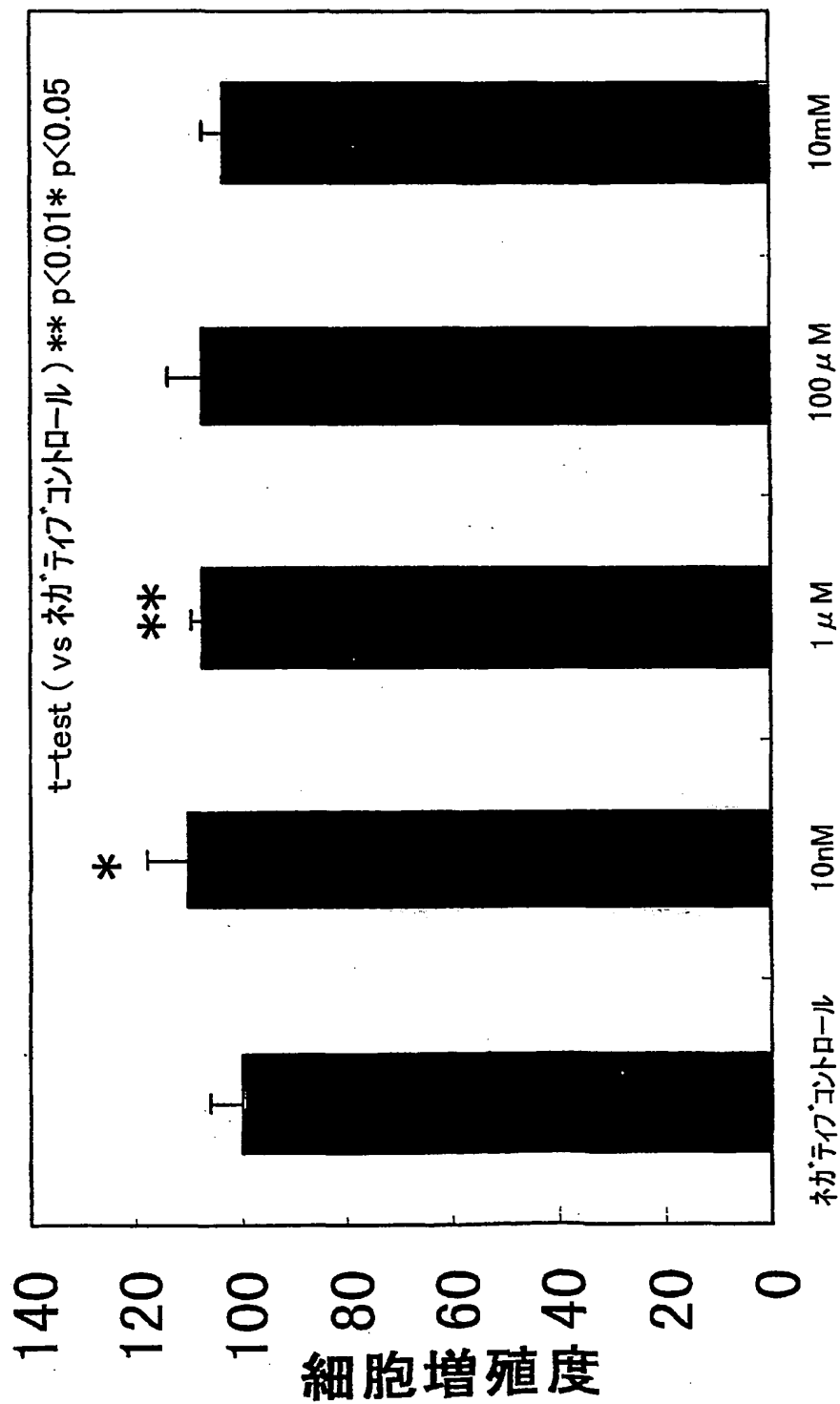
請求の範囲

1. タウリンを有効成分とする細胞賦活剤。
2. タウリンを有効成分とする毛髪細胞コントロール剤。
- 5 3. タウリンを有効成分とする毛髪成長期延長剤。
4. タウリンを有効成分とする毛髪細胞増殖活性剤。
5. タウリンを有効成分とする毛包上皮系細胞増殖活性剤。
6. タウリンを有効成分とする外毛根鞘細胞増殖活性剤。
7. タウリンを有効成分とする毛髪はり・こし改善剤。

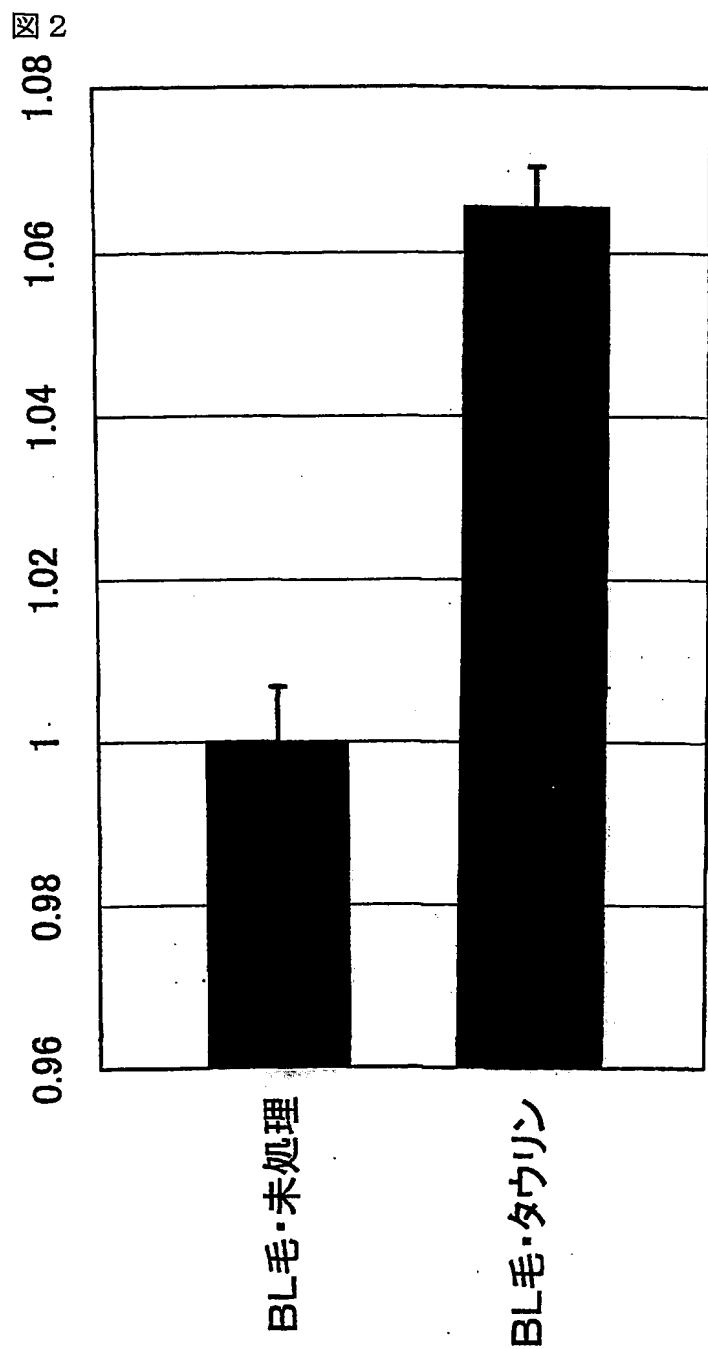
1/2

図 1

毛根鞘細胞増殖評価試験 タウリンの効果



2/2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07915

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K31/185, 7/00, 7/075, 7/08, A61P43/00, 17/14, 17/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K31/185, 7/00, 7/075, 7/08, A61P43/00, 17/14, 17/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-292753 A (Dowa Yakushou K.K.), 26 October, 1999 (26.10.99), (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.131:303228	1-7
X A	JP 5-310549 A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 November, 1993 (22.11.93), especially, page 2, left column, Par. No. [0004], [Means to Solve the Problems] (Family: none)	1 2-7
A X	EP 286261 A2 (Redken Laboratories, Inc.), 12 October, 1988 (12.10.88), & US 4793992 A & JP 63-255214 A	1-6 7
P,A P,X	JP 2001-19622 A (Dowa Yakushou K.K.), 23 January, 2001 (23.01.01), (Family: none) & Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, Ohio, USA), DN.134:120573	1-6 7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "C" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 November, 2001 (07.11.01)		Date of mailing of the international search report 20 November, 2001 (20.11.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/07915

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/185, 7/00, 7/075, 7/08, A61P43/00, 17/14, 17/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/185, 7/00, 7/075, 7/08, A61P43/00, 17/14, 17/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 11-292753 A(同和薬粧株式会社) 26. 10月. 1999 (26. 10. 99) (No family) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 131:303228	1-7
X A	JP 5-310549 A(大正製薬株式会社) 22. 11月. 1993 (22. 11. 93) 特に、第2頁左欄【0004】【課題を解決するための手段】 (No family)	1 2-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 11. 01

国際調査報告の発送日

20.11.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 隆信

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A X	EP 286261 A2 (REDKEN LABORATORIES INC.) 12. 10月. 1988 (12. 10. 88) & US 4793992 A & JP 63-255214 A	1-6 7
P, A P, X	JP 2001-19622 A (同和薬粧株式会社) 23. 1月. 2001 (23. 01. 01) (No family) & Database CAPLUS on STN, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), DN. 134:120573	1-6 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.